

**Средство для ингибирования репродукции оболочечных вирусов,
способ его получения, фармацевтическая композиция и способ
ингибирования вирусных инфекций.**

5

Область техники.

Изобретение относится к фармацевтической промышленности и касается создания средства для ингибирования репродукции оболочечных вирусов.

10

Настоящее изобретение касается соединений и их фармацевтически приемлемых солей, вызывающих торможение репликации вирусов, имеющих гликолипидную оболочку, таких как: вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), вирус герпеса простого (ВПГ), вирус гепатита С (ВГС).

15

Предшествующий уровень техники.

В настоящее время исследования ведутся по разработке терапии и методов лечения вирусных инфекций, особенно вызванных ВПГ, ВГС и ВИЧ/СПИД и связанного со СПИД комплекса. Больные СПИДом, иммунная система которых нарушена, страдают от многочисленных оппортунистических инфекций, вызванных такими патогенами, как *Pneumocystis carinii* и *Candida albicans*, ВПГ, цитомегаловирус (ЦМВ), ВГС или от некоторых видов опухолей (саркома Капоши), которые и становятся непосредственной причиной смерти. Способ лечения СПИД неизвестен, и текущая терапия в большинстве случаев применяется без достаточных доказательств эффективности и имеет неблагоприятные побочные эффекты.

25

ВИЧ характеризуется высокой генетической и, следовательно, антигенной изменчивостью. Штаммы ВИЧ, полученные даже от одного и того же больного, но на разных стадиях его заболевания, могут отличаться по антигенным свойствам и нуклеотидным последовательностям. Наблюдается отличие штаммов в разных

30

BEST AVAILABLE COPY

климатогеографических зонах. Это осложняет химиотерапию, иммунотерапию и вакцинопрофилактику СПИДа.

Большинство антивирусных средств, используемых до сих пор для лечения ВПГ-инфекций, включающие иодоксиуридин, цитозин, арабинозу, аденинарабинозид и трифтортимидин, являются веществами, которые нарушают синтез вирусной ДНК. Эти вещества влияют также и на сходные функции клетки-хозяина, что приводит к проблемам клеточной токсичности и, как следствие, невозможности систематического использования у людей. В настоящее время основным лекарственным средством для лечения инфекций, вызванных ВПГ, является ацикловир, которое имеет сильное противовирусное действие и низкую токсичность. Однако слабая растворимость и появление лекарственно устойчивых вирусов ограничивает применение этого средства.

До сих пор не разработана вакцина против гепатита С, а из лечебных препаратов известны, в основном, интерферон или интерферон в сочетании с виразолом. Лечение этими препаратами характеризуется высокой стоимостью и недостаточно эффективно. Известно, что лишь 25-40% людей, инфицированных ВГС, чувствительны к лечению интерфероном.

Химиотерапия СПИДа связана в настоящее время с созданием и применением ингибиторов обратной транскриптазы, а также ингибиторов протеазы ВИЧ. Ингибиторы обратной транскриптазы (ревертазы) ВИЧ имеют или нуклеозидную природу: зидовудин (AZT, ретровир), эпивир (ЗТС, ламивудин), видекс (ddI, дидианозин), хивид (ddC, зальцитабин), зерит (d4T, ставудин), абакавир (ABC, зиаген), комбивир (зидовудин + эпивир), тризивир (абакавир+ эпивир+ зидовудин), или ненуклеозидную: делапирдин (рескриптор), невирапин (вирамун), эфавиренц (сутива), или нуклеотидную: тенофовир, виреад. В России зарегистрирован отечественный препарат фосфазид. Эти препараты токсичны и для макроорганизма, поскольку они вмешиваются в геномные структуры. Обратная транскриптаза осуществляет синтез

вирусной ДНК в течение всего срока заболевания, поэтому ингибиторы ревертазы ВИЧ необходимо использовать пожизненно.

Ингибиторы протеазы ВИЧ представлены в настоящее время несколькими препаратами: саквинавир (инвираза), индинавир (криксиван), ритонавир (норвир), нельфинавир (вирасепт), ампренавир (агенераза), калетра (лопинавир+ритонавир). Протеаза ВИЧ ответственна за созревание (процессинг) вирусных белков. Нарушение процессинга гликопротеинов приводит к неспособности вирионов ВИЧ присоединяться к CD4-клетке.

10 В настоящее время существует термин «терапия третьей линии» для характеристики лечения больных ВИЧ/СПИД, у которых возбудитель оказался резистентным по крайней мере к одному лекарству из каждого класса препаратов или у кого лечение при использовании двух различных схем терапии оказалось
15 неэффективным. Такую высоко активную антиретровирусную терапию (ВААРТ) обозначают также терминами "мега-ВААРТ" или "гига-ВААРТ". Терапия третьей линии включает применение одновременно четырех антиретровирусных препаратов с различными механизмами блокирования репродукции ВИЧ - нуклеозидные и ненуклеозидные
20 ингибиторы обратной транскриптазы, и ингибиторы протеазы. При этом сложнее прогнозировать возможные негативные взаимодействия различных лекарств, в результате - резко увеличивается вероятность развития побочных реакций и осложнений. В таких случаях необходим постоянный мониторинг концентрации лекарств в сыворотке крови, что
25 является дорогостоящей процедурой. Необходимость дополнения терапевтического курса препаратами, подавляющими активность возбудителей сопутствующих инфекций, еще больше осложняет лечебный процесс.

Известные лекарственные препараты позволяют
30 контролировать течение болезни, но не излечивать пациентов, страдающих СПИДом. Создание лекарственных средств, которые могут излечивать или, по меньшей мере, обеспечивать лучшую защиту от смертоносного вируса продолжается и связано как с поиском новых

соединений, способных тормозить репродукцию вируса при помощи известных механизмов, так и с разработкой новых подходов к решению задачи.

Расширяется спектр препаратов для лечения больных
5 ВИЧ/СПИД. В настоящее время на стадии клинических исследований находятся следующие препараты: эмтрицитабин, DAPD (нуклеозидные аналоги), каправирин, TMC-120 (ненуклеозидные). Внимание привлекают также новые ингибиторы протеазы: атазанавир (зривада), типранавир, мозенавир. Ведутся исследования по созданию препаратов
10 совершенно новых классов: ингибиторы интегразы (S-1360), а также ингибиторы слияния (пентафузид (T-20 или Fuzeon)), T-1249, PRO-542, и ингибиторы рецепторов хемокинов (SCH-C и PRO-140). Однако результаты испытаний неоднозначны. Так, препарат SCH-C вызывал увеличение интервала QT в ЭКГ здоровых испытуемых при
15 использовании максимальной дозы, что является указанием на возможные кардиологические осложнения. Ингибиторы слияния представляют собой полипептиды: T-20 состоит из 36 остатков природных аминокислот, T-1249 – из 39. Использование этих препаратов ограничено внутривенным введением; в результате приема
20 у некоторых больных, получавших T-20, образовывались подкожные узелки, эпизодически отмечались подкожные инфекции и абсцессы.

Внимания заслуживают также высокополимерные полианионные природные соединения – пептидогликаны, декстраны, полисахариды и др. Эти соединения мало токсичны и способны адсорбировать вирусные
25 частицы и служить ксенобиотической «ловушкой» вирионов ВИЧ. Показано, что эти вещества ингибируют образование синцитиев, но прямого воздействия этих лекарств на инфекционность вируса не было установлено (Европейские заявки 04065512 и 0467185). В отношении сульфонированной полимочевины высказано предположение (RU
30 2160746), что эти вещества с молекулярной массой от 2000 до 4000 подавляют активность ВИЧ, ВПГ и ЦМВ по следующему механизму: анионные группы синтетических олигомеров связываются с вирусом

и/или клеточной мембраной и, тем самым, прерывают способность вируса к репликации.

Большинство известных наиболее опасных вирусов: ВИЧ, ВПГ, ЦМВ, ВГС, вирус гриппа являются типичными представителями оболочечных вирусов. Инфицирование клетки-хозяина оболочечными вирусами изначально основывается на взаимодействии различных рецепторов на поверхности клетки-хозяина с гликопротеинами вируса. Затем вирусная и клеточная мембраны сливаются, и содержимое вириона вливается в цитоплазму клетки-хозяина. Вмешательство в этот процесс могло бы предотвратить первичное взаимодействие вируса и клетки-хозяина и последующее слияние, а также тормозить формирование вирионов.

В патенте (WO 95/199491995) впервые была показана возможность воздействия одним соединением на две мишени: на протеазу и обратную транскриптазу ВИЧ. В патенте (RU 2196602) впервые предложен способ одновременного ингибирования репликации ВИЧ и ЦМВ-инфекции. Ингибирование осуществляли по механизму блокирования активного сайта на молекуле протеазы и обратной транскриптазы, и позднего структурного белка gB ЦМВ человека. В обоих патентах использовали производные одного соединения – фуллерена.

В последнее время биологическая активность фуллеренов привлекает внимание в связи с возможностью применения их в борьбе против вирусов. Основное препятствие на пути создания лечебных препаратов связано с нерастворимостью фуллеренов в воде, что затрудняет их прямое введение в организм человека.

Известны способы получения водорастворимых форм фуллерена за счет образования аддукта с поливинилпирролидоном (Kiselev O.I. et al. // Mol. Materials. 1998. V.11. P.121; Piotrovsky L.B. et al. // Ibidem. 2000. V.13. P.41.). Показана его эффективность против вируса гриппа А - и В-типа.

Известен также способ получения фуллеренов, включающий смешивание предварительно растворенных в органическом

растворителе фуллеренов с полимерной матрицей в хлороформе, выпаривание смеси под вакуумом до полного удаления растворителей, растворение полученного комплекса в фосфатно-солевом буфере (pH 7,4 – 7,6) с последующей обработкой продукта ультразвуком (RU 2162819, 2001). При этом в качестве водорастворимой полимерной матрицы используют мембранные кефалины.

Продукты, полученные в результате таких модификаций, являются неустойчивыми соединениями, водные растворы которых представляют собой суспензии, что ограничивает возможность их применения и хранения.

Перспективным направлением является создание водорастворимых производных фуллерена химическим синтезом. Аналогами настоящего изобретения являются соединения, и способы их получения, описанные в патентах WO 95/19949, RU 2196602, RU 2124022, US 6613771.

Известно соединение, содержащее водорастворимое производное фуллерена с общей формулой $C_{60}-X = \text{HOC(O)}(\text{CH}_2)_2\text{C(O)NH}(\text{CH}_2)_2$ (WO 95/19949, 1995, US 6613771, 2003). В качестве заместителей используются любые алкиловые или арил – алкиловые заместители, в частности те, которые замещаются азотом или кислородом, содержащим от 1 до 20 атомов углерода. Однако данное соединение имеет низкую растворимость в воде, равную 1 мг/мл, и способ его получения сложный.

В патенте RU 2196602 предложен способ ингибирования репродукции ВИЧ и ЦМВ-инфекции при помощи соединений на основе аминокислотных и дипептидных производных фуллерена. В качестве аминокислотного производного фуллерена использованы натриевые соли фуллеренмоноаминокапроновой и фуллеренмоноаминомасляной кислот.

Наиболее близким по технической сущности и достигаемому результату является соединение N-(моногидро)-фуллеренаминокапроновая кислота $\text{HC}_{60}\text{NH}(\text{CH}_2)_5\text{COOH}$ (RU 2124022).

Для его получения к раствору фуллерена в о-дихлорбензоле добавляют водный раствор калиевой соли аминокaproновой кислоты и 18-краун-6. Реакционную массу перемешивают 6-8 часов при 60°C. Затем растворители отгоняют, остаток обрабатывают насыщенным раствором хлористого калия, и остаток фуллеренового производного промывают водой. Выход целевого продукта количественный. Полученная N-(моногидро)-фуллеренаминокaproновая кислота растворима в диметилсульфоксиде, диметилформамиде, пиридине.

Недостатками данного синтеза являются: условия реакции взаимодействия фуллерена C₆₀ и калиевой соли аминокaproновой кислоты в двухфазной системе приводят к увеличению времени процесса, кроме того, используемый в качестве солюбилизатора 18-краун-6 имеет высокую стоимость.

Выход целевого продукта мал и составляет не более 5% от массы затраченного на синтез фуллерена.

Во всех описанных ранее патентах были получены продукты моноприсоединения аминокислот и пептидов к фуллерену. Однако фуллерены имеют большое число эквивалентных реакционных центров по двойным связям, что дает возможность образования продуктов полиприсоединения.

Раскрытие изобретения.

Задачей настоящего изобретения - создание средства на основе фуллеренполикарбоновых анионов для подавления активности оболочечных вирусов при лечении заболеваний, вызываемых этими вирусами.

Для решения поставленной задачи предложена группа изобретений, объединенных единым изобретательским замыслом: средство, представляющее собой соединение - фуллеренполикарбоновый анион, способ его получения, фармацевтическая композиция, включающая указанное средство и способ ингибирования репликации оболочечных вирусов.

Сущность изобретения заключается в решении указанной задачи в средстве для ингибирования репродукции оболочечных вирусов, которое представляет собой водорастворимое соединение фуллеренполикарбоновых анионов общей формулы



где C_{60} – фуллереновое ядро,

$NH(CH_2)_mC(O)O^-$ – аминокарбоновый анион

m равно целому числу, предпочтительно 3 и 5, наиболее предпочтительно 5,

10 n равно целому числу от 2 до 12, предпочтительно от 4 до 6, наиболее предпочтительно 6.

Поставленная задача решается также в способе получения средства для ингибирования репродукции оболочечных вирусов, в котором в раствор фуллерена в *o*-дихлорбензоле вносят аминокислоту
15 в виде калиевой или натриевой соли, далее добавляют солюбилизатор, выбранный из группы полиалкиленоксидов: полиэтиленгликоли мол массы от 150 до 400 и выше, а также диметилловые эфиры полиэтиленгликолей, или 18-краун-6, при этом количество аминокислоты должно превышать количество фуллерена более чем в
20 50 раз, а синтез проводят при температуре 60-80° С.

Для решения поставленной задачи также предложена фармацевтическая композиция для ингибирования репродукции оболочечных вирусов, содержащая водорастворимое соединение фуллеренполикарбоновых анионов общей формулы



где C_{60} – фуллереновое ядро,

$NH(CH_2)_mC(O)O^-$ – аминокарбоновый анион

m равно целому числу, предпочтительно 3 и 5, наиболее предпочтительно 5,

30 n равно целому числу от 2 до 12, предпочтительно от 4 до 6, наиболее предпочтительно 6

в эффективном количестве и фармацевтически приемлемые наполнители.

Фармацевтическая композиция для ингибирования репродукции оболочечных вирусов выполнена в форме таблеток, капсул, раствора для инъекций, суппозиторияев.

В способе ингибирования репродукции оболочечных вирусов используют охарактеризованную выше фармацевтическую композицию для подавления вирусов при лечении заболеваний, вызванных ВИЧ/СПИД, герпес-инфекциями, вирусным гепатитом С.

В результате взаимодействия фуллереина с солью аминокислоты в среде органического растворителя в присутствии полиалкиленоксида получены водорастворимые фуллеренполикарбоновые анионы общей формулы (I).



где C_{60} — фуллереновое ядро,

$NH(CH_2)_mC(O)O^-$ — аминокарбоновый анион

m равно целому числу, предпочтительно 5.

n равно целому числу от 2 до 12, предпочтительно от 4 до 6.

Например:

$C_{60}H_2[NH(CH_2)_3C(O)O^-]_2$ — фуллерен-ди-аминомасляный анион

$C_{60}H_2[NH(CH_2)_5C(O)O^-]_2$ — фуллерен-ди-аминокапроновый анион

$C_{60}H_4[NH(CH_2)_5C(O)O^-]_4$ — фуллерен-тетра-аминокапроновый анион

$C_{60}H_6[NH(CH_2)_5C(O)O^-]_6$ — фуллерен-гекса-аминокапроновый анион

$C_{60}H_6[NH(CH_2)_7C(O)O^-]_6$ — фуллерен-гекса-8-аминооктановый анион

Молекулярный вес связан со значением n и m полученных соединений:

при $n = 4$ и $m = 5$ $C_{60}H_4[NH(CH_2)_5C(O)O^-]_4$ (фуллерен-тетра-амино-капроновый анион) — равен 1240 г.

при $n = 6$ и $m = 5$ $C_{60}H_6[NH(CH_2)_5C(O)O^-]_6$ (фуллерен-гекса-амино-капроновый анион) — равен 1500 г.

Для получения средства к раствору фуллереина в о-дихлорбензоле (толуоле или любом другом приемлемом органическом растворителе) вносят аминокислоту в виде соли (калиевой или

натриевой), затем добавляют солюбилизатор. Порядок внесения в реакционную среду аминокислоты и солюбилизатора не важен, можно вносить их в виде комплекса, предварительно смешав. В качестве солюбилизатора используют различные полиалкиленоксиды: 5 полиэтиленгликоли мол массы от 150 до 400, и выше 400 (например, ПЭГ-1500), а также полиэтиленгликоли, имеющие замещенные концевые группы (например, полиэтиленгликоль диметиловый эфир мол массы 500) или циклическое строение (например, 18-краун-6 для калиевых солей).

10 Соотношение фуллерена и аминокислоты по данному изобретению увеличено более чем в 50 раз. При соотношении менее чем в 50 раз получают соединения с меньшей растворимостью в воде и высокой токсичностью.

Оптимальная температура проведения синтеза – $+(60-80)^{\circ}\text{C}$.

15 Превращение в желаемую фармацевтически приемлемую соль, особенно натриевую или калиевую, может выполняться путем обработки кислоты подходящим основанием. В частности, нерастворимая в воде фуллеренполикарбоновая кислота превращается в более предпочтительные фармацевтически приемлемые соли, такие 20 как натриевая соль, которые растворимы в воде.

Выход целевого продукта составляет не менее 150 % по взятому фуллерену. Целевой продукт по данному изобретению характеризуется постоянством состава, содержание в целевом продукте основного вещества составляет более 90%.

25 Соединения формулы (1) – твердые, темно-коричневые кристаллические вещества, без запаха, растворимые в воде в солевой форме и не растворимые в воде в кислотной форме. Натриевые соли заявленных соединений при растворении в воде образуют непрозрачные растворы насыщенного красно-коричневого цвета. 30 Натриевые соли соединений формулы (1) растворимы в ледяной уксусной кислоте, не растворимы в 96% спирте, о-дихлорбензоле, толуоле и ацетоне. В кислотной форме заявленные соединения хорошо растворяются в DMSO (Пример 1.).

Соединения формулы (1) при 400°C и выше сгорают полностью в отличие от фуллерена, который при температуре 420 °C плавится.

Методом ИК-спектроскопии в области 399-4000 см⁻¹ подтверждена подлинность заявленных соединений формулы (1):
5 совпадение по рисунку и наличию полос поглощения с фуллереном составило более 90%, с аминокислотой - не менее 80%, воспроизводимость в синтезах - не менее 80%. Для производных фуллерена, отличающихся аминокислотными радикалами, такого сходства не установлено (Пример 2).

10 Особенностью строения полученных соединений является наличие в молекуле нескольких карбоксильных групп, которые в зависимости от pH среды, находятся или в солевой, или в кислотной форме, проявляя буферные свойства. pH перехода заявленных соединений в растворенное состояние— 5,0-6,0.

15 ТСХ выполнялась на силикагеле 60F₂₅₄ фирмы "Merck". Наилучшие результаты по разделению компонентов были получены с системой элюентов: EtOH-бензол-H₂O 4:1:1,5. В системе было обнаружено 3 пятна с R_f равные 0,82, 0,71 и 0,47 для производного фуллерена с аминкапроновой кислотой, по одному пятну с
20 аминookтановой (R_f = 0,82) и аминомасляной (R_f = 0,47). Проба с нингидрином показала отсутствие в продукте соединений с первичной аминогруппой (Пример 3).

¹H и ¹³C-ЯМР спектры растворов соединений формулы (1) в дейтрированных растворителях с различной сольватирующей
25 способностью сняты при 20°C на приборе WM-200 с рабочей частотой 200,13 МГц по ¹H и 50,32 МГц по ¹³C.

¹³C-ЯМР (δ, D₂O): 25,2 (CH₂CH₂C(O)O-), 25,4 (CH₂(CH₂)₂C(O)O-), 26,8 (CH₂C(O)O-), 69,5 (CH₂NH), 130-160 (C₆₀), 183,7 (C(O)O-).

¹H-ЯМР (δ, CD₃OD): 1,16д (1H, J=6,0 Гц, -NH-), 1,26; 1,45 и 1,65
30 (3м, 1H, 2H, 3H соответственно, -(CH₂)₃-), 2,18; 2,23 (2с, 0,2H, -NH...), 2,34т (2H, J=7,2 Гц, -CH₂C(O)O-), 2,94ушир.т. (0,4H, J=6,0 Гц, J=1,8 Гц, -NCH₂-), 3,6м (1H, J=1,8 Гц, J=6,0 Гц, C₆₀H).

12

^1H -ЯМР (δ , DMSO- d_6): 1,02д (0,4H, $J=6,0$ Гц, -NH-), 1,22; 1,32 и 1,52 (3м, 6H, $-(\text{CH}_2)_3-$), 1,90; 2,08 (2с, 0,3H каждый, -NH...), 2,20т (2H, $J=7,2$ Гц, $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{O}-$), 2,68кв. (2H, $-\text{NCH}_2-$), 7,46м; 8,17с (0,5H каждый, C_{60}H), 12,08уш.с (1H; $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$).

5 ^1H -ЯМР (δ , D_2O): 1,25м; 1,49м (2H, 4H, соответственно, $J=7,8$ Гц, $J=6,9$ Гц, $-(\text{CH}_2)_3-$), 1,88д (0,1H, $J=1,6$ Гц, -NH...), 1,89д (0,1H, $J=5,5$ Гц, -NH...), 2,05д (0,1H, $J=1,6$ Гц, -NH...), 2,24т (2H, $J=7,3$ Гц, $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{O}-$), 2,82уш.т (1,5H, $J=1,6$ Гц, $J=7,5$ Гц, $-\text{NCH}_2-$), 3,49м; (1H, $J=5,5$ Гц, C_{60}H).

Следующие свойства предлагаемых соединений обусловлены присутствием фуллеренового ядра в молекуле. Обилие изолированных кратных связей позволяет считать фуллерен полиолефиновой системой. Для него наиболее типично присоединение по кратной связи. Он легко присоединяет нуклеофилы и свободные радикалы, что делает возможным использование подобных веществ в качестве антиоксидантов.

15 Технический результат изобретения состоит в том, что создан новый класс соединений – фуллеренполикарбоновых анионов общей формулы (1) за счет нуклеофильного присоединения к фуллерену аминокислоты по нескольким двойным связям с количеством двух и более аминокислот.

20 Соединения обладают новыми свойствами, отличными от фуллерена, лучшей растворимостью в воде в отличие от аналогов, что обеспечивает высокую эффективность воздействия на инфицированные клетки и низкую токсичность заявленных соединений.

25 Особенностью заявляемых соединений является широкий спектр противовирусной активности в отношении различных вирусов, патогенных для человека, в том числе ВИЧ, ВПГ, ВГС.

В экспериментах показано, что при всех исследованных способах заражения клеток под действием соединений формулы (1) происходит ингибирование вирусиндуцированного цитопатического действия и снижение уровня антигена вируса в культуральной жидкости. Так, препарат – натриевая соль фуллеренполиаминокапроновой кислоты в концентрации 1 мкг/мл обеспечивал полную защиту

перевиваемых лимфобластоидных клеток человека МТ-4 от вирусного цитопатического действия (ЦПД) ВИЧ-1, взятого в дозе 100 ТЦД₅₀ до 7-10 суток наблюдения после заражения клеточных культур. При концентрации препарата 10 мкг/мл вирус в культуральной среде не определялся. В этих концентрациях и выше (до 100 мкг/мл) цитотоксического действия препарата на клетки не обнаружено. Показано отсутствие влияния заявленных соединений в изученных концентрациях 1, 10 и 100 мкг/мл на биосинтетические процессы в культуре клеток лимфоцитов в течение 96-ти часов, установленное методом электрофореза белков и нуклеиновых кислот в 12,5% ПААГ с окраской нитрата серебра по отсутствию изменений белковых и нуклеиновых профилей. В клетках, инфицированных вирусом иммунодефицита человека, после 24-48 часов культивирования профили слабее, чем в нормальной культуре и в присутствии препарата. В то же время, в присутствии заявленных соединений в изученных концентрациях (1 и 10 мкг/мл), профили вирусинфицированных клеток по интенсивности и спектру полос соответствуют контрольной культуре. Другие производные фуллерена: с аминomásляной и 8-аминооктановой кислотами – показали противовирусную активность в отношении ВИЧ-1 ниже по сравнению с аминокaproновой (Пример 4).

Заявленное соединение: натриевая соль фуллеренполиаминокaproновой кислоты в концентрации 10 мкг/мл обеспечивало полную защиту клеток перевиваемой культуры почек обезьян (VERO) и фибробластов эмбриона человека (М-21) от цитодеструктивного действия вируса простого герпеса (ВПГ-1), взятого в дозе 100 ТЦД₅₀ через 48 часов после заражения клеточных культур. В течение того же времени в контрольных инфицированных клеточных культурах, не подвергшихся воздействию предложенных соединений, происходила 100 % гибель клеток. Соединения формулы (1) – производные фуллерена с различными аминокислотами - отличаются противовирусной активностью в отношении ВПГ-1 (Пример 5).

- Оценку противовирусной активности соединений формулы (1) проводили на экспериментальной модели инфекции, вызванной ВГС в культурах перевиваемых клеток почек эмбриона свиньи (СПЭВ). В работе использовали цитопатогенный штамм вируса гепатита С, относящийся к генотипу 1b, в дозе 10 ТЦД₅₀. Так, натриевая соль фуллеренполиаминокапроновой кислоты в концентрации 100 мкг/мл обеспечивала 100% жизнеспособность ВГС-инфицированных клеток на 7-ой день после заражения. Полученные результаты показали, что препарат в концентрации до 100 мкг/мл не обладает цитотоксическими свойствами для культур клеток СПЭВ. В тоже время, в культурах клеток, инфицированных ВГС, уже к 4-му дню развивались цитопатогенные явления, которые поражали 30-40% монослоя, а к 7-му дню, как правило, все ВГС-инфицированные клетки погибали. Препарат проявил аналогичную активность и в случае, когда ВГС-инфицированные клетки были обработаны препаратом через 24-часа после заражения. Однако наибольшей противовирусной активностью препарат обладает при внесении его одновременно с вирусом: титры вируса в культурах клеток СПЭВ снижались на 7,4 lg при концентрации препарата 100 мкг/мл и 3,0 lg - 50 мкг/мл (Пример 6).
- Установлен эффект торможения пролиферации перевиваемых клеток эпителиальной карциномы человека Нер2 под воздействием заявленных соединений. Так, натриевая соль фуллеренполиаминокапроновой кислоты в концентрациях 10, 50 и 100 мкг/мл (наиболее выражено при 100 мкг/мл) тормозит образование монослоя раковых клеток Нер2, что может быть отражением его влияния на митотическую активность. Торможение пролиферации подтверждено снижением скорости формирования монослоя, меньшим количеством белков в пробах, содержащих препарат, и снижением в них количества нуклеиновых кислот. Получены данные, свидетельствующие об отсутствии индукции апоптоза под влиянием препарата: не зафиксировано фрагментации ДНК, не обнаружено перераспределения растворимой и мембранной форм мРНК, свидетельствующего о возможности Fas-зависимого апоптоза (Пример 7).

Фармацевтические готовые формы препаратов соединений формулы (1) могут быть выполнены в лекформе для орального или парентерального назначения для терапии или профилактики вирусных инфекций и состояний, при которых показано применение антиоксидантов и антидотов.

Соединения смешивают с обычными фармацевтическими носителями и эксцipientами и используют в форме таблеток, капсул, свечей, мазей, растворов для инъекций и т.д. Композиции, включающие соединения формулы (1), содержат примерно 0,1-90 % по массе активного соединения, наиболее предпочтительно 0,5-10 %. Соединения настоящего изобретения могут применяться орально, парентерально или ректально, включая традиционные нетоксичные фармацевтически приемлемые носители, стимуляторы и вспомогательные агенты. Такие фармацевтические композиции могут выпускаться в виде орально применяемых капсул или таблеток; стерильных препаратов для инъекций или свечей. Для орального применения в виде капсул и таблеток композиции готовят согласно методам, широко известным в области приготовления фармацевтических рецептур, и они могут содержать микрокристаллическую целлюлозу, крахмал для обеспечения массы, стеарат магния и лактозу и/или другие эксцipientы, связующие вещества, расширители, дезинтеграторы, разбавители и смазывающие вещества, известные в данной области. Растворы для инъекций могут формироваться согласно известным методам, с использованием нетоксичных, парентерально применимых разбавителей или растворителей, таких как маннит, 1,3-бутандиол, вода, раствор Рингера или изотонический раствор хлористого натрия. При ректальном применении в виде свечей такие композиции могут готовиться путем смешивания лекарства с таким не раздражающим эксцipientом, как масло какао, синтетические глицеридные сложные эфиры или полиэтиленгликоли, которые являются твердыми веществами при обычных температурах, но плавятся и/или растворяются в ректальной полости с выделением лекарства (Пример 8).

Предлагаемые соединения могут быть использованы для лечения инфекций, вызываемых ВИЧ, ВПГ, ВГС. Лечение инфекционных заболеваний путем воздействия фармацевтически приемлемых доз соединениями по формуле 1 осуществляется одновременно на нескольких вирусах и затрагивает различные стадии репликации вируса. Показано, что лечение сопровождается снижением стрессового эффекта на введение препарата, усилением антиоксидантной защиты организма от инфекций. Интоксикация организма характерна для течения ряда вирусных инфекций и обуславливает тяжесть заболевания. Расчетные данные показали, что уровни дозировок порядка 0,1-250 или 2500 мг/день могут использоваться для лечения или профилактики указанных выше состояний, причем оральные дозировки в 2-5 раз выше. Конкретный уровень дозировок и частота приема лекарства для каждого конкретного пациента может изменяться, и, будет зависеть от большого числа факторов, включая активность выбранного соединения, метаболическую стабильность и его время действия, возраст пациента, вес тела, общее состояние здоровья, пол, тип и время применения, скорость выведения, лекарственные комбинации (Пример 9).

Возможны сочетания соединений формулы (1) с другими антивирусными агентами, иммуномодуляторами, противоинфекционными агентами или вакцинами в различных комбинациях с любыми фармацевтическими составами, предназначенными для лечения.

Краткое описание чертежей.

На фиг. 1 представлен спектр натриевой соли фуллеренполиаминокапроновой кислоты на ИК-спектрометре «AVATAR 320-FT.IR», NICOLET, США, с программным обеспечением EZ OMNIC, NICOLET, США.

На фиг. 2.1 – подтверждение подлинности натриевой соли фуллеренполиаминокапроновой кислоты методом ИК-спектроскопии с помощью программного обеспечения EZ OMNIC, NICOLET, США (наличие фуллеренового ядра)

5 На фиг. 2.2 – подтверждение подлинности натриевой соли фуллеренполиаминокапроновой кислоты методом ИК-спектроскопии с помощью программного обеспечения EZ OMNIC, NICOLET, США (аминокапроновая кислота).

10 На фиг. 3 – ИК-спектры и полосы поглощения образцов натриевой соли фуллеренполиаминокапроновой кислоты, выполненные на ИК-спектрометре «AVATAR 320-FT.IR», NICOLET, США, с программным обеспечением EZ OMNIC, NICOLET, США.

15 На фиг. 4 – ИК-спектры и полосы поглощения образцов фуллеренполиаминокапроновой и фуллеренполиаминомасляной кислот, выполненные на ИК-спектрометре «AVATAR 320-FT.IR», NICOLET, США, с программным обеспечением EZ OMNIC, NICOLET, США.

20 На фиг. 5 – ТСХ соединений формулы (1). Показаны три пятна с R_f 0,82, 0,71, 0,47 для образцов натриевой соли фуллеренполиаминокапроновой кислоты (АКК-15, АКК-21, АКК-22 – указаны номера синтезов), для натриевой соли фуллеренполиаминомасляной кислоты (АМК) – $R_f=0,47$, для натриевой соли фуллеренполиаминооктановой кислоты (АОК) – $R_f=0,82$, фуллерен остался на старте.

25 На фиг. 6 показано влияние соединений формулы (1) на биосинтетические процессы в культуре лимфобластоидных клеток человека, инфицированных ВИЧ-1, в течение 96-ти часов. Представлены электрофореграммы белков:

- 30 а) незараженной клеточной культуры;
б) инфицированной ВИЧ-1;
в) незараженных клеток в присутствии препарата (натриевой соли фуллеренполиаминокапроновой кислоты) в концентрации 1 мкг/мл;
г) ВИЧ-инфицированных с препаратом 1 мкг/мл;

д) незараженных клеток в присутствии препарата в концентрации 10 мкг/мл;

е) ВИЧ-инфицированных с препаратом 10 мкг/мл.

На фиг 7.1, 7.2 – сравнительное действие соединений формулы (1) (фул) и ацикловира: защита клеток VERO (А) и М21 (Б) от цитопатического действия вируса герпеса, тип 1. Используются результаты, полученные для натриевой соли фуллеренполиаминокапроновой кислоты в концентрациях 10, 50 и 100 мкг/мл.

На фиг. 8 – мембранная (а) и растворимая (в) формы Fas-антигена при воздействии натриевой соли фуллеренполиаминокапроновой кислоты в концентрациях 10, 50, 100 мкг/мл на перевиваемую культуру клеток эпителиальной карциномы человека Нер 2.

Лучшие примеры осуществления изобретения.

Пример 1. Синтез. Характеристика некоторых соединений формулы (1).

Навеску фуллерена 2,5 г растворяют в о-дихлорбензоле (о-ДХБ), добавляют половину объема ПЭГ-500 и калиевую соль аминокaproновой кислоты в мольном отношении 1:1 с ПЭГ. Реакционную смесь выдерживают не менее 4-х часов при температуре 70°C при перемешивании. Растворитель удаляют, а осадок высушивают до исчезновения запаха о-ДХБ. Соединения в кислой форме получают путем добавления около 120 мл 8% соляной кислоты, pH равен 5,0, а в виде соли – путем растворения в 0,1 н гидроокиси натрия, pH равный 7,0. Выход: 5,6 г продукта, 224% по взятому фуллерену.

Навеску фуллерена 360 мг растворяют в толуоле. В раствор вносят 16 г калиевой соли аминокapcляной кислоты и 50 г ПЭГ-500. Далее как описано выше. Выход: 540 мг, 150% по взятому фуллерену.

Растворимость фуллерена и его производных приведена в таблице 1.

Пример 2.

Спектрометрическое исследование в ИК-области спектра соединений формулы (1) в виде кислоты или их натриевых солей проводили в диске с KBr. Для этого 1 мг предварительно высушенного
5 препарата смешивали в ступке с 150 мг спектрометрически чистого калия бромида и смесь прессовали при давлении 7,5-10 см⁻¹ в течение 2-5 мин.

Спектр полученного образца снимали на ИК-спектрометре «AVATAR 320-FT.IR», NICOLET, США, с программным обеспечением EZ
10 OMNIC, NICOLET, США. Спектральные параметры: разрешение 4 см⁻¹, формат – оптическая плотность, диапазон 399-4000 см⁻¹, частота выборки 1.929 см⁻¹. Обработку спектра проводили путем коррекции линии H₂O/CO₂ (фиг.1). Параллельно в тех же условиях снимали ИК-спектры поглощения фуллерена и используемых в синтезе
15 аминокислот.

Для подтверждения присутствия в заявленных соединениях аминокислоты и фуллерена использовали метод вычитания спектров с последующей обработкой результатов с помощью программного обеспечения EZ OMNIC, NICOLET, США (фиг. 2.1, 2.2). Совпадение
20 рисунков ИК-спектров и полос поглощения образцов натриевой соли фуллеренполиаминокапроновой кислоты и фуллеренполиаминокапроновой кислоты, полученных разными синтезами, составило выше 80% (На фиг. 3 показаны номера синтезов). Совпадение рисунков для фуллеренполиаминомасляной и фуллеренполиаминокапроновой
25 кислот существенно ниже (фиг. 4).

Пример 3.

ТСХ. Разделение соединений формулы (1) методом ТСХ.

Готовят испытуемые растворы соединений формулы (1): натриевых солей фуллеренполиаминокапроновой кислоты,
30 фуллеренполиаминомасляной и фуллеренполиаминооктановой в воде с концентрацией 1 мг/мл. Фуллерен растворяют в толуоле.

На линию старта хроматографической пластинки «Силуфол» размером 10x15 см с толщиной слоя 0,1 мм наносят 10 мкл (10 мкг) испытуемых растворов.

5 Пластинку сушат на воздухе в течение 10 мин., затем помещают в камеру со смесью растворителей спирт бензол : 96% спирт : вода (1:4:1,5) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 10 см от линии старта, пластинку вынимают из камеры, сушат на воздухе в течение 20 мин.

10 На хроматограмме обнаружены три пятна с R_f 0,82, 0,71, 0,47 для фуллеренполиаминокапроновой, для фуллеренполиаминомасляной - 0,47, для фуллеренполиаминооктановой - 0,82, фуллерен остался на старте (фиг. 5).

ТСХ. Для оценки содержания свободной аминокислоты в препарате.

15 Готовят испытуемый раствор натриевой соли фуллеренполиаминокапроновой кислоты в воде с концентрацией 1 мг/мл.

В качестве сравнения используют водные растворы аминокaproновой кислоты (АКК) следующих концентраций: 0,05 мг/мл (5%) и 0,01 мг/мл (1%).

20 На линию старта хроматографической пластинки «Силуфол» размером 10x15 см с толщиной слоя 0,1 мм наносят 10 мкл (10 мкг) испытуемого раствора и по 10 мкл растворов сравнения.

Пластинку сушат на воздухе в течение 10 мин., затем помещают в камеру со смесью растворителей спирт н-бутиловый : 96% спирт : вода (2:2:1) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 10 см от линии старта, пластинку вынимают из камеры, сушат на воздухе в течение 20 мин, затем в сушильном шкафу при температуре 95-100°C в течение 10 мин.

30 Охлажденную пластинку опрыскивают 0,25% раствором нингидрина в ацетоне, сушат на воздухе в течение 5 мин., затем в сушильном шкафу при температуре от 95 до 100° С в течение 5 мин.

На хроматограмме испытуемого раствора кроме основных пятен допускается наличие пятна розового цвета, не превышающее по величине и интенсивности окраски пятна на хроматограмме раствора сравнения (не более 5% или 1% соответственно).

- 5 Приготовление 0,25% раствора нингидрина . 0,25 г нингидрина помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 20 мл ацетона, доводят объем до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

10 **Пример 4.** Оценка противовирусной активности соединений формулы (1) на модели лимфобластоидных клеток человека в отношении ВИЧ-1.

Клетки. Использовали перевиваемые лимфобластоидные клетки человека МТ-4. Клетки культивировали в концентрации 3,0-5,0·10⁵ клеток в 1 мл среды RPMI 1640 с 10% сыворотки эмбрионов, 100 мкг/мл гентамицина. Жизнеспособность клеток определяли окраской 0,4% раствора трипанового синего.

15 Вирусы. В качестве источника вируса использовали штамм ВИЧ-1_{899A}, из коллекции штаммов вирусов иммунодефицита человека НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН.

20 В качестве положительного контроля использовали ретровир (азидотимидин) фирмы GlaxoWellcome (Великобритания).

Определение противовирусной активности. Исследование противовирусной активности препаратов проводили на модели лимфобластоидных клеток в пластиковой 24-луночной панели. Доза вируса 100 ТЦД₅₀ (50% тканевая цитопатическая доза). Культуры инкубировали при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ 98% влажности в течение 5-7 дней до момента учета результатов. Определение активности препарата проводили по ингибированию вирусиндуцированного цитопатического действия (ЦПД) в культурах клеток и уровня антигена вируса в культуральной жидкости методом иммуноферментного анализа.

30 Полная защита клеток от вирусного ЦПД отмечена при дозе препарата (натриевой соли фуллеренполиаминокапроновой кислоты) 1

мкг/мл (табл. 2). В этих концентрациях цитотоксическое действие препарата на клетки не обнаружено (табл. 3). Определена концентрация препарата, при которой происходит исчезновение вируса в культуральной среде (табл. 5). Изучены различные схемы введения
5 препарата (табл. 7.1 и 7.2). Показано, что ни аминакапроновая кислота, ни ПЭГ (таблица 6) подобным эффектом в отношении ингибиции ВИЧ не обладают.

Изучение влияния соединений формулы (1) на биосинтетические процессы в культуре клеток лимфоцитов, инфицированных ВИЧ-1,
10 проводили методом электрофореза белков и нуклеиновых кислот в 12,5% ПААГ с окраской нитрата серебра. После культивирования клетки осаждались центрифугированием и помещались в раствор, содержащий: трис, pH 8,0, ЭДТА, тритон X305, PMSF. Результаты оценивали по изменениям белок-нуклеиновых профилей в исходной
15 культуре, вирусинфицированной и в присутствии препарата в концентрациях 1, 10 и 100 мкг/мл при воздействии на незараженные клетки и 1, 10 мкг/мл - на ВИЧ-инфицированные в течение 96-ти часов (Фиг. 6).

Другие производные фуллерена: натриевые соли
20 фуллеренполиаминомасляной и фуллеренполиаминооктановой кислот показали противовирусную активность в отношении ВИЧ-1 ниже по сравнению с фуллеренполиаминокапроновой (табл.8 и 9).

Пример 5. Оценка противовирусной активности соединений формулы (1) на модели перевиваемых культур клеток почки обезьян
25 (VERO) и фибробластов эмбриона человека (M-21) в отношении ВПГ-1.

Клетки. В исследовании были использованы перевиваемые культуры клеток почки обезьян (VERO) и фибробластов эмбриона человека (M-21), полученные из коллекции тканей Института вирусологии им. И.Д. Ивановского РАМН.

30 Вирусы. В исследовании был использован вирус герпеса простого (Herpes simplex virus), тип 1, штамм Л₂, размноженный в клетках VERO.

В качестве положительного контроля использовали ацикловир фирмы «АЗТ».

Исследование цитотоксического действия. Препарат (натриевую соль фуллеренполиаминокапроновой кислоты) вносили в концентрации 500 и 1000 мкг/мл в культуральную среду неинфицированных клеток на стадии образования монослоя. Наблюдения за исследованными культурами в течение 3 суток не обнаружило цитодеструктивного действия исследуемых веществ.

Защитный эффект натриевой соли фуллеренполиаминокапроновой кислоты в концентрациях 1,0; 10 и 50 мкг/мл изучался при внесении препарата через 30 и 60 минут после заражения культур вирусом при инфицирующей дозе вируса в 100 ТЦД₅₀. Полученные результаты показали, что препараты в концентрациях 10 и 50 мкг/мл обеспечивали полную защиту клеток VERO и М-21 от цитодеструктивного действия ВПГ-1 через 48 часов после заражения клеточных культур. На этом сроке наблюдения в контрольных инфицированных клеточных культурах, не подвергшихся воздействию испытываемых соединений, отмечалась 100 % гибель клеток (Фиг. 7). В присутствии ПЭГ и аминокaproновой кислоты в концентрациях от 10^{-4} М до 10^{-2} М защиты клеток от ВПГ не наблюдалось.

Соединения формулы (1) в зависимости от аминокислотного радикала имеют различную противовирусную активность в отношении ВПГ-1 (табл. 10).

Пример 6. Оценка противовирусной активности соединений формулы (1) на экспериментальной модели инфекции, вызванной ВГС в культурах клеток.

В работе использовали цитопатогенный штамм вируса гепатита С, относящийся к генотипу 1b. Штамм был выделен из сыворотки крови больной хроническим вирусным гепатитом С, идентифицирован как вирус гепатита С. В исследовании использовали инфекционные дозы ВГС, равные 10 ТЦД 50/20 мкл.

Исследование проводилось в лаборатории НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН.

Были использованы высоко чувствительные к цитопатогенному действию ВГС культуры перевиваемых клеток почек эмбриона свиньи (СПЭВ), полученные из фирмы «Нарвак», Россия. Их использовали в виде однодневного монослоя клеток, выращенного в 24-луночных пластиковых панелях. Культуры клеток СПЭВ выращивали на среде 199 с 10% сыворотки эмбриона телят с добавлением глутамина и антибиотиков (100 ЕД/мл).

Для титрования остаточной инфекционности вируса использовали ту же линию клеток почки эмбриона свиньи (СПЭВ).

В опыте использовали различные разведения препарата натриевой соли фуллеренполиаминокапроновой кислоты – от 100 мкг/мл и ниже на среде 199. Для изучения противовирусной активности препарата, его в различных концентрациях вносили в культуры клеток СПЭВ в момент заражения и через 24 часа после заражения вирусом гепатита С на лунку в 24-луночных пластиковых культуральных панелях.

Жизнеспособность культур клеток СПЭВ, инфицированных и неинфицированных ВГС, изучали на 7-й день после заражения.

Для определения остаточной инфекционной активности ВГС пробы культуральной жидкости отбирали из лунок через три дня после обработки препаратом инфицированных клеток и титровали на культурах клеток СПЭВ. Инфекционную активность ВГС учитывали по результатам титрования на 6-7 день после заражения, когда развивалось максимальное цитопатогенное действие вируса, используя формулу Рида и Менча для подсчета титра вируса гепатита С.

Полученные результаты показали, что препарат в концентрации до 100 мкг/мл не обладает цитотоксическими свойствами для культур клеток СПЭВ (табл. 11).

Препарат в концентрации 100 мкг/мл обеспечивал 100% жизнеспособность ВГС-инфицированных клеток на 7-ой день после заражения (табл. 12). В этих же условиях препарат реаферон индуцировал также 100% выживаемость клеток.

В тоже время, в культурах клеток, инфицированных ВГС в дозе 10 ТЦД 50/клетка, уже к 4-му дню развивались цитопатогенные явления, которые поражали 30-40% монослоя, а к 7-му дню, как правило, все ВГС-инфицированные клетки погибали.

5 Препарат проявил аналогичную активность и в случае, когда ВГС-инфицированные клетки были обработаны препаратом через 24-часа после заражения. Однако наибольшей противовирусной активностью препарат обладает при внесении его одновременно с вирусом: титры вируса в культурах клеток СПЭВ снижались на 7,4 lg при
10 концентрации препарата 100 мкг/мл и 3,0 lg - 50 мкг/мл (табл.13).

Пример 7. Влияние соединений формулы (1) на пролиферацию перевиваемых клеток эпителиальной карциномы человека Нер 2.

В экспериментах использована суточная культура клеток Нер 2
14 пассажа – перевиваемые клетки эпителиальной карциномы
15 человека.

Ростовая среда содержала ДМЕМ + глутамин+антибиотики +5% ФБС (фетальная бычья сыворотка). Поддерживающая среда – ДМЕМ/игла с двойным набором аминокислот и витаминов + глутамин+антибиотики +10% сыворотки КРС.

20 Изучение влияния препарата на примере натриевой соли фуллеренполиаминокапроновой кислоты на биосинтетические процессы в культуре клеток показало, что препарат в изученных концентрациях 10, 50 и 100 мкг/мл вызывал выраженное торможение пролиферации клеток Нер 2. Наиболее выражено эффект влияния
25 проявился на седьмые сутки при 100 мкг/мл: появились разрывы монослоя, в культуральной среде много конгломератов клеток.

Монослой снимали со стекла в объеме среды 500 мкл. Осаждали клетки из 200 мкл, ресуспендировали в лизирующем буфере, проводили электрофорез белков в 12,5% ПААГ с окраской Кумаси.

30 На вторые сутки и наиболее ярко на седьмые сутки наблюдали снижение выраженности белковых профилей при изученных концентрациях препарата по сравнению с контролем, что может свидетельствовать об уменьшении количества клеток из-за торможения

митотической активности клеток в присутствии препарата. На 7 сутки воздействия препарата наблюдали снижение количества ДНК по сравнению с контролем. Проверка наличия фрагментации ДНК показала ее отсутствие; т. проявлений апоптоза не обнаружено.

5 С целью установления влияния препарата на внутриклеточные биосинтетические процессы проведен анализ синтеза и созревания в клетках Нер2 мРНК Fas-антигена. Fas-антиген является белком-рецептором сигнала программированной гибели клеток – апоптоза – и может существовать в двух формах – мембранной и растворимой.

10 Показано, что в присутствии препарата происходит перераспределение альтернативных форм мРНК Fas-антигена, что свидетельствует о влиянии препарата на биосинтетические процессы в клетках Нер2 на уровне транскриптона, однако, перестройки, свидетельствующие о возможности реализации Fas-зависимого апоптоза отсутствуют (фиг.8).

15 **Пример 8.** В качестве примеров дозированных форм согласно изобретению приведены следующие составы:

Суппозитории ректальные, в состав которых входят соединения формулы (1) – 0,1-200 мг, обычно 5-20 мг, пропиленгликоль до 10%, липофильная основа до 2 г.

20 Капсулы: соединения формулы (1) – 0,1-1000 мг, обычно 50-200 мг, крахмал или его заменитель – до необходимого количества для заполнения капсулы.

25 Растворы для инъекций включают соединения формулы (1) – 0,1-1,0 % от объема, обычно 0,5%, хлористый натрий 850 мг, хлористый калий – 30 мг. Вода для инъекций до 100 мл.

Пример 9.

30 Больной А, 1981 года рождения, ранее не получавший противовирусные препараты. С августа 2003 года установлена 3А стадия заболевания. Диагностировали ЦМВ-инфекцию, латентное течение, кандидоз ротоглотки и мочевыводящих путей, простой герпес, рецидивирующее течение. Сопутствующие заболевания: хронический пиелонефрит, рецидивирующий бактериальный, хронический гепатит С с низкой репликацией. Исходные данные лабораторного анализа:

27

количество РНК в плазме 1200000 копий/мл, титр вируса в лимфоцитах равен 1 : 8, количество Т4-лимфоцитов 59 мм³, наличие антител к ВИЧ-1. Изъявил добровольное желание на лечение с помощью препарата согласно изобретению. Лечение проводилось по следующей схеме:

5 первый месяц препарат (натриевая соль фуллеренополиаминокапроновой кислоты) - свечи по 20 мг ректально каждый день по одной свече в течение 3-х месяцев.

Больной В, 1980 года рождения. Установлена ВИЧ-инфекция 3А стадия с августа 2003 года. Распространенная герпетическая инфекция

10 с поражением гениталий, паховых и ягодичных областей. Кандидоз ротоглотки. ЦМВ-инфекция латентное течение. Сопутствующие заболевания: хронический гепатит В интегративная форма. Исходные лабораторные данные: количество РНК в плазме 140000 копий/мл, титр вируса в лимфоцитах равен 1 : 4, количество Т4-лимфоцитов 163

15 мм³, Т-индекс равен 0,6, общее количество лимфоцитов 0,53 x10⁶ / мл, наличие антител к ВИЧ-1, что позволяет сделать вывод о заболевании. Изъявил добровольное желание на лечение с помощью препарата согласно изобретению. Лечение проводилось по следующей схеме: свечи по 20 мг ректально через три дня по одной свече в день в

20 течение 3-х месяцев. Данные клинических анализов пациентов приведены в таблице 14.

Использование препарата согласно изобретению показывает об улучшении состояния пациентов.

25

30

35

Таблица 1.

Растворимость фуллерена и его производных.

Соединение	Растворите ли			
	Вода	Ледяная уксусная кислота	Толуол	о-дихлорбензол
Фуллерен	нет	нет	да	да
Фуллеренполиаминокапроновая кислота	нет	да	нет	нет
Натриевая соль фуллеренполиаминокапроновой кислоты	да	да	нет	нет
Натриевая соль фуллеренполиаминомасляной кислоты	да	да	нет	нет
Натриевая соль фуллеренполиаминооктановой кислоты	да	да	нет	нет

Таблица 2.

Исследование противовирусной активности натриевой соли фуллеренполиаминокапроновой кислоты в отношении вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) на модели лимфобластоидных клеток (5 день).

Условия опыта,		Жизнеспособность клеток, %	Количество клеток в 1 мл х 1000	ЦПЭ/синцитии, %
Контроль клеток*		89	1566	0
Контроль вируса**		35	188	100
Препарат, мкг/мл	0,25	67	1000	50
	0,5	71	1299	25
	1,0	79	1466	0
	10	87	1633	0
	100	89	1500	0

Примечание: * - контроль неинфицированных клеток

** - контроль вируса – 100 ТЦД₅₀

Таблица 3.

Исследование цитотоксичности натриевой соли
фуллеренполиаминокапроновой кислоты на модели лимфобластоидных
клеток человека.

Условия опыта,	Жизнеспособность клеток, %	Количество клеток в 1 мл х 1000
Контроль клеток*	93	966
Препарат, 100 мкг/мл	85	866

Примечание: * - контроль неинфицированных клеток

Таблица 4.

Исследование активности референс-препарата «Ретровир» (0,3 мкг/мл) в
отношении вируса иммунодефицита человека на модели культур клеток

Условия опыта, мкг/мл	Жизнеспособность клеток, %	Количество клеток в 1 мл х 1000	ЦПЭ/синцитии, %
Контроль клеток*	93	1300	0
Контроль вируса**	6	<<300	100
Ретровир	92	1200	0

Примечание: * - контроль неинфицированных клеток

** - контроль вируса – 100 ТЦД₅₀

Таблица 5.

Исследование активности препаратов в отношении вируса иммунодефицита человека на модели культур клеток методом иммуноферментного анализа (6 день).

Препарат	Концентрация, мкг/мл	Оптическая плотность
Контроль клеток	-	0,073
Контроль вируса	-	1,583
Ретровир	0,3	0,055
Натриевая соль	0,5	2,147
фуллеренполиамино- капроновой кислоты	1,0	0,165
	10	0,074

Примечание: значения > 0,086 положительные на ВИЧ

Таблица 6.

Исследование активности ПЭГ в отношении вируса иммунодефицита человека на модели культур клеток (6 день)

Условия опыта	Токсичность		ВИЧ-инфекция		
	Жизне- способнос- ть клеток, %	Количество клеток x 10 ³ /мл	Жизне- способнос- ть клеток, %	Количес- тво клеток x 10 ³ /мл	ЦПЭ/ синцитии, %
Контроль клеток	96	1500	-	-	0
Контроль вируса	-	-	42	<300	100
ПЭГ, 10 ⁻⁴ М	92	499	47	366	100
ПЭГ, 10 ⁻³ М	95	460	48	433	100
ПЭГ, 10 ⁻² М	57	<300	47	<300	100

Таблица 7.1

Противовирусная активность натриевой соли
фуллеренполиаминокапроновой кислоты в зависимости от схемы
внесения препарата на модели лимфобластоидных клеток человека в отношении
ВИЧ-1.

Условия опыта, мкг/мл	Жизнеспособность клеток, %	Количество клеток в 1 мл x 1000	ЦПЭ/синцитии, %
Контроль клеток*	96	1100	0
Контроль вируса**	38	<300	100
Препарат за 2 ч до инфицирования	96	1100	0
Препарат + вирус одновременно	94	1100	0
Препарат 1 ч после инфицирования	92	1100	0

Таблица 7.2.

Противовирусная активность натриевой соли фуллеренополиаминокпроновой кислоты в зависимости от различных схем внесения препарата на модели лимфобластоидных клеток человека в отношении ВИЧ-1.

Условия опыта	Экспозиция	Отмывание клеток	6 день		8 день		
			Жизнеспособность клеток, %	Количество клеток $\times 10^3$ /мл	ЦПЭ/синцитии, +	Жизнеспособность клеток, %	ЦПЭ/синцитии, +
1	2	3	4	5	6	7	8
Контроль клеток	весь опыт	нет	91	2500	0	91	0
Контроль вируса	весь опыт	нет	32	400	+4	0	4+
Препарат, 1 мкг/мл	весь опыт	нет	83	2300	0	84	0
Препарат, 10 мкг/мл	весь опыт	нет	91	2500	0	88	0
Препарат, 1 мкг/мл	1 ч	да	83	2000	0,5+	64	1,5+
Препарат, 10 мкг/мл	1 ч	да	84	2300	0	91	0
Препарат, 1 мкг/мл	2 ч	да	88	1700	0,5+	79	1+
Препарат, 10 мкг/мл	2 ч	да	93	1800	0	91	0
Препарат, 1 мкг/мл	24 ч	Да	87	2100	0,1+	89	0,5+

1	2	3	4	5	6	7	8
Препарат, 10 мкг/мл	24 ч	Да	92	2300	0	91	0
Препарат, 1 мкг/мл	2 ч контакта	Нет	87	2200	0	87	0
Препарат, 10 мкг/мл	2 ч контакта	Нет	89	2600	0	89	0
Препарат, 1 мкг/мл	2 ч контакта	Да	69	1700	2,5+	17	3,5+
Препарат, 10 мкг/мл	2 ч контакта	Да	74	1500	1,75+	35	3,0+

Таблица 8.

Исследование цитотоксичности препаратов производных фуллерена на модели лимфобластоидных клеток человека в отношении ВИЧ-1.

Препарат	Концентрация, мкг/мл			
	100		300	
	Жизнеспособность клеток, %	Количество клеток $\times 10^3/\text{мл}$	Жизнеспособность клеток, %	Количество клеток $\times 10^3/\text{мл}$
АМК*	76	150	79	60
АОК*	79	150	82	150
Контроль клеток	95	250	-	-

Таблица 9.

Противовирусная активность производных фуллерена на модели лимфобластоидных клеток человека в отношении ВИЧ-1.

Условия опыта	Концентрация препарата, мкг/мл	Жизнеспособность клеток, %	ЦПЭ/синцитии, %
Контроль клеток	0	87	0
Контроль вируса	0	42	100
АМК*	0,1	52	25
	0,5	65	15
	1,0	71	10
	10,0	72	0
АОК*	0,1	50	25
	0,5	53	25
	1,0	57	25
	10,0	60	0

АОК – натриевая соль фуллеренполиаминооктановой кислоты

АМК – натриевая соль фуллеренполиаминомасляной кислоты

Таблица 10.

Исследование противогерпетической активности производных фуллерена
на модели культуры клеток почки обезьян (VERO).

Препарат	Концентрация, мкг/мл	Степень защиты от ЦПД вируса, %	
		A*	B*
АМК	1,0	0,0	33,3
	10,0	33,3	33,3
	25,0	100	100
	50,0	100	100
АОК	1,0	33,3	100
	10,0	100	100

Вирус: ВПГ-1, 10 ТЦД₅₀/мл

*Время контакта вещества с клетками: А – 24 часа, В – 48 часов

Таблица 11.

Цитотоксические свойства натриевой соли фуллеренполиаминокапроновой кислоты в отношении культуры перевиваемых клеток почек эмбриона свиньи (СПЭВ).

Культура клеток	% погибших клеток при экспозиции с разными концентрациями препарата в течение 48 часов (в мкг)				
	100	50	25	12,5	6,25
СПЭВ	0	0	0	0	0

Таблица 12.

Жизнеспособность ВГС-инфицированных культур клеток СПЭВ в присутствии натриевой соли фуллеренполиаминокапроновой кислоты на 7-ой день после инфицирования.

Схема введения препарата	% выживших клеток СПЭВ					
	Концентрации препарата, в мкг/мл					
	Контроль					
	100	50	25	12,5	6,25	
В момент инфекции	100	75	0	0	0	0
Через 24 часа после инфекции	100	50	0	0	0	0

Таблица 13.

Противовирусная активность натриевой соли фуллеренполиаминокапроновой кислоты, изученная на модели культур клеток СПЭВ, инфицированных ВГС.

Схема введения препарата	Титры вируса гепатита С (lg ТЦД 50/20 мкл) в пробах среды, отобранных на 3-й день после инфекции					
	Концентрации препарата, в мкг/мл					
	Контроль					
	100	50	25	12,5	6,25	
В момент инфекции	2,1	6,2	9,3	9,5	9,7	9,5
Через 24 часа после инфекции	3,0	8,5	9,5	9,9	9,0	9,1

Таблица 14.

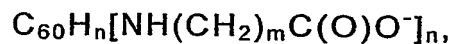
Исследование образцов крови ВИЧ-инфицированных пациентов,
получавших терапию препаратом.

Образец	Дата	Титр вируса*	ПЦР, РНК копии/мл	Т4- лимфоци ты, мм ³	Т8- лимфоци ты, мм ³	Т- индекс
Больной А	До лечения	8	1,200,000	59	63	0,9
	Через 1 мес.	2	72,000	355	455	0,8
	Через 2 мес.	2	43,000	234	219	1,1
	Через 3 мес.	0	44,000	381	409	0,9
Больной В	До лечения	4	140,000	163	257	0,6
	Через 1 мес.	128	180,000	581	464	1,3
	Через 2 мес.	2	3,500	329	329	1,0
	Через 3 мес.	1	2,000	325	401	0,8

Примечание: *- величина, обратная разведению образца, дающего 50% ЦПЭ (или синцитий) в культуре клеток

Формула изобретения

1. Средство для ингибирования репродукции оболочечных вирусов, характеризующееся тем, что оно представляет собой водорастворимое соединение фуллеренполикарбоновых анионов общей формулы



где C_{60} – фуллереновое ядро,

$NH(CH_2)_mC(O)O^-$ – аминокарбоновый анион

m равно целому числу, предпочтительно 3 и 5, наиболее предпочтительно 5,

n равно целому числу от 2 до 12, предпочтительно от 4 до 6, наиболее предпочтительно 6.

2. Способ получения средства для ингибирования репродукции оболочечных вирусов, характеризующийся тем, что в раствор фуллерена в о-дихлорбензоле вносят аминокислоту в виде калиевой или натриевой соли, далее добавляют солюбилизатор, выбранный из группы полиалкиленоксидов: полиэтиленгликоли мол массы от 150 до 400 и выше, а также диметилвые эфиры полиэтиленгликолей, или 18-краун-6, при этом количество аминокислоты должно превышать количество фуллерена более чем в 50 раз, а синтез проводят при температуре 60-80° С.

3. Фармацевтическая композиция для ингибирования репродукции оболочечных вирусов, характеризующаяся тем, что она содержит средство по п.1 в эффективном количестве и фармацевтически приемлемые наполнители.

4. Фармацевтическая композиция для ингибирования репродукции оболочечных вирусов по п. 3, характеризующаяся тем, что она выполнена в форме таблеток, капсул, раствора для инъекций, суппозиториев.

5. Способ ингибирования репродукции оболочечных вирусов, характеризующийся тем, что используют фармацевтическую композицию по пп. 3 и 4 для подавления вирусов при лечении заболеваний, вызванных ВИЧ/СПИД, герпес-инфекциями, вирусным гепатитом С.

10

15

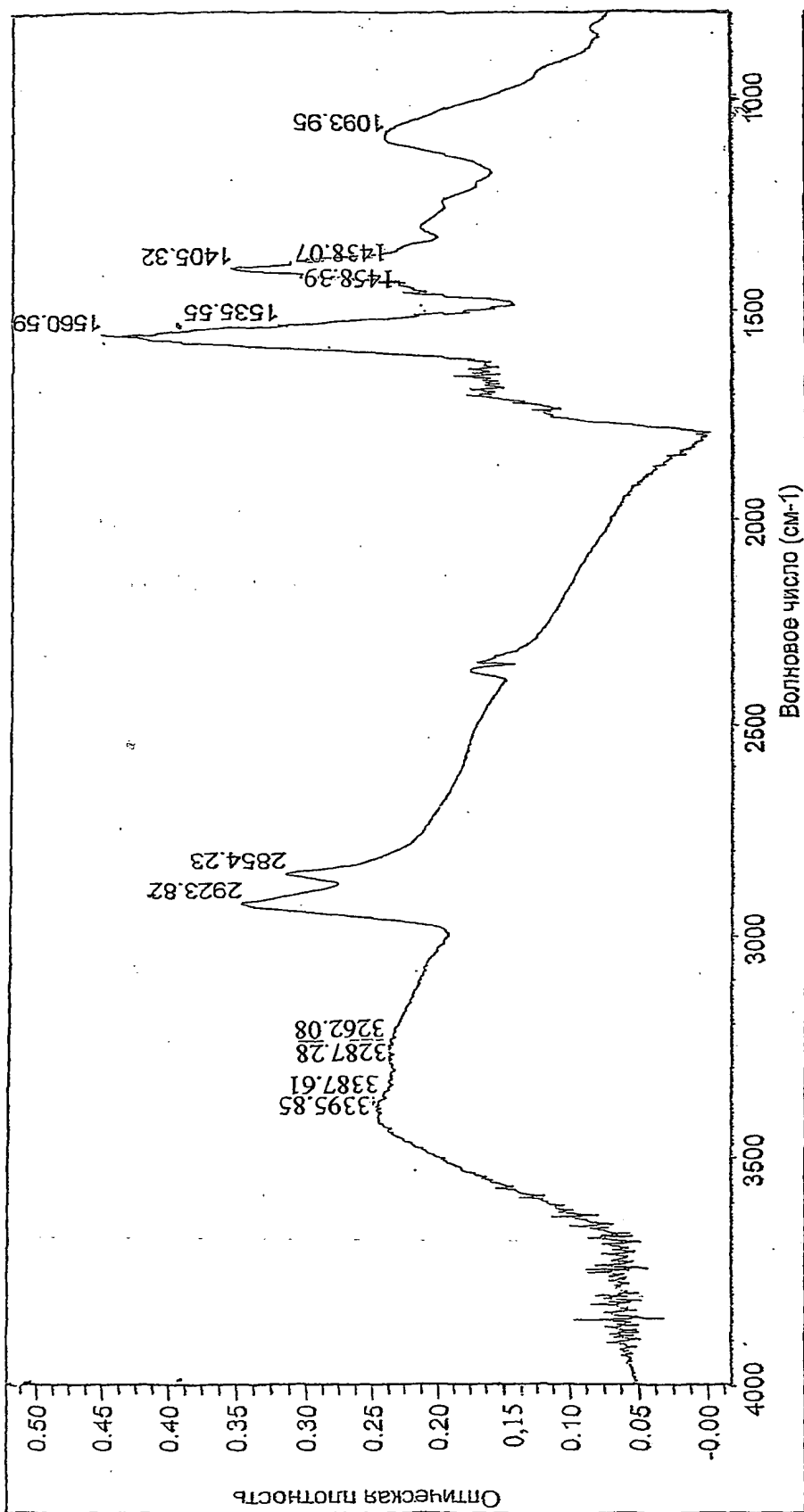
20

25

30

THIS PAGE BLANK (USPTO)

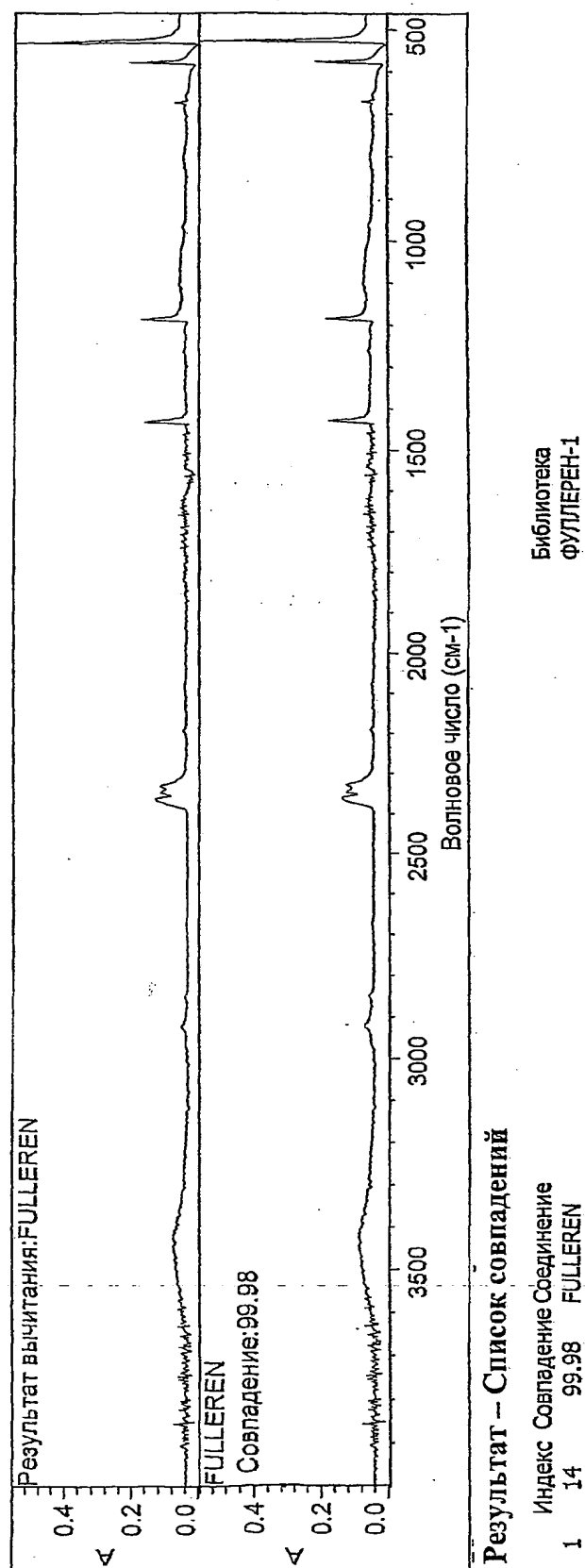
6/1



Фиг. 1

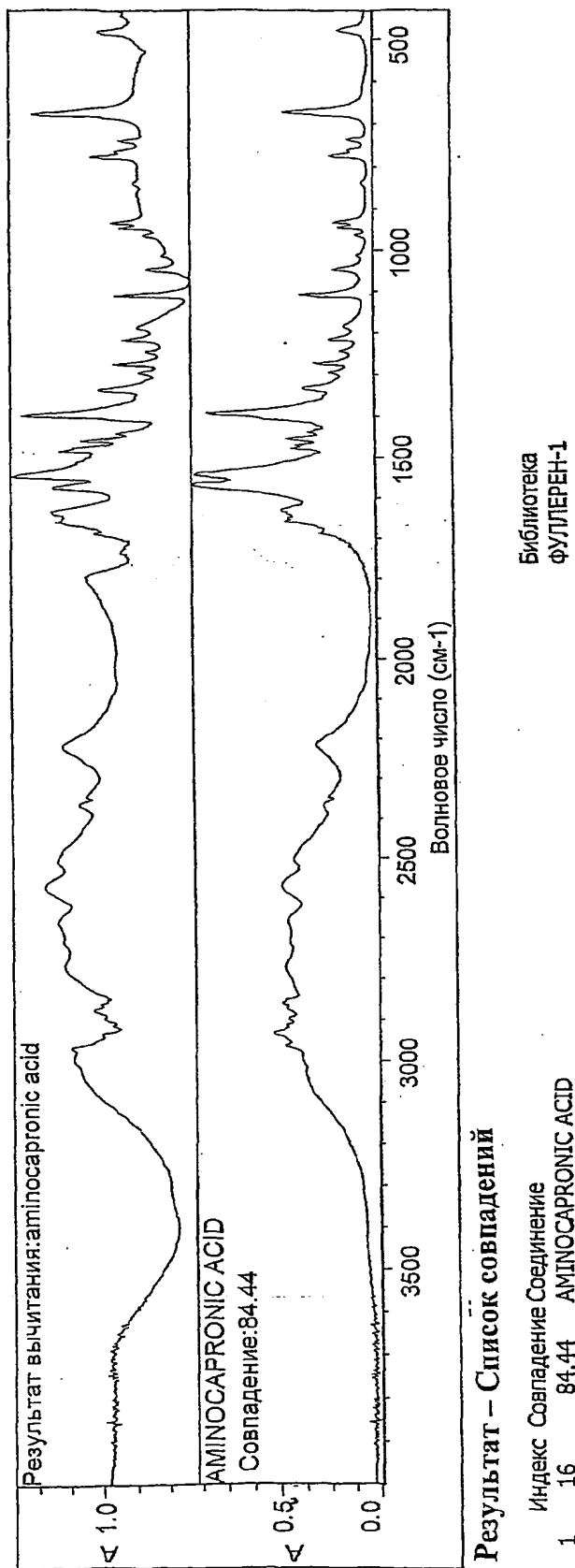
THIS PAGE BLANK (USPTO)

2/9



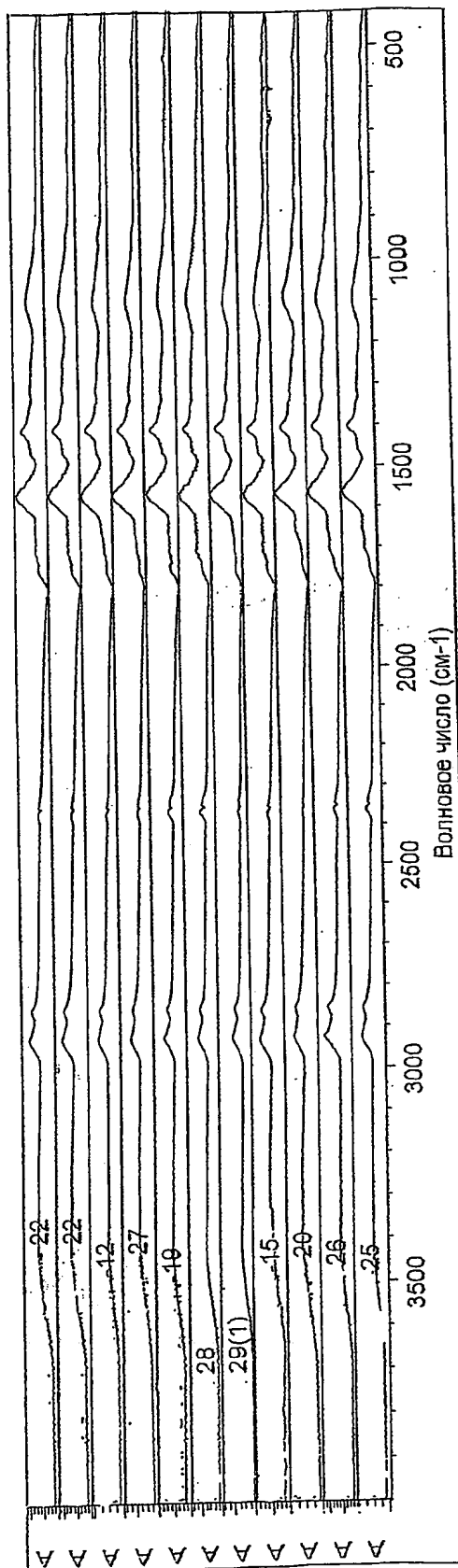
Фиг. 2.1

THIS PAGE BLANK (USPTO)



Фиг. 2.2

THIS PAGE BLANK (USPTO)



Результат – Список совпадений

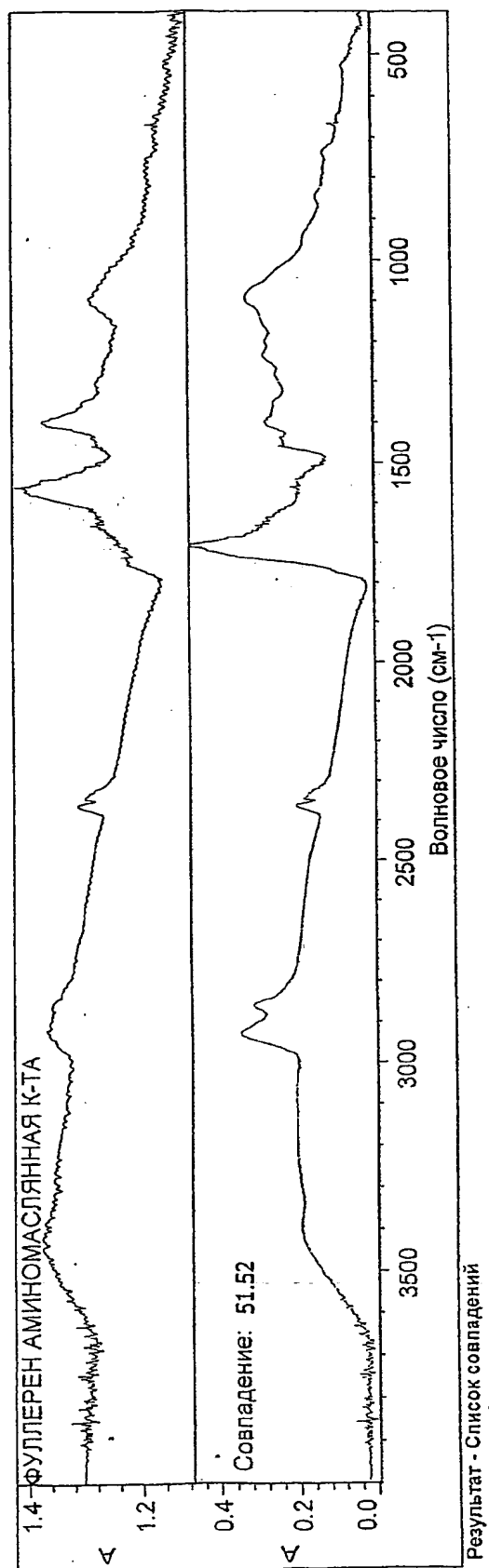
Совпадение

1	100.00
2	96.75
3	93.11
4	92.36
5	91.16
6	90.07
7	89.66
8	88.69
9	88.26
10	88.19

Фиг. 3

THIS PAGE BLANK (USPTO)

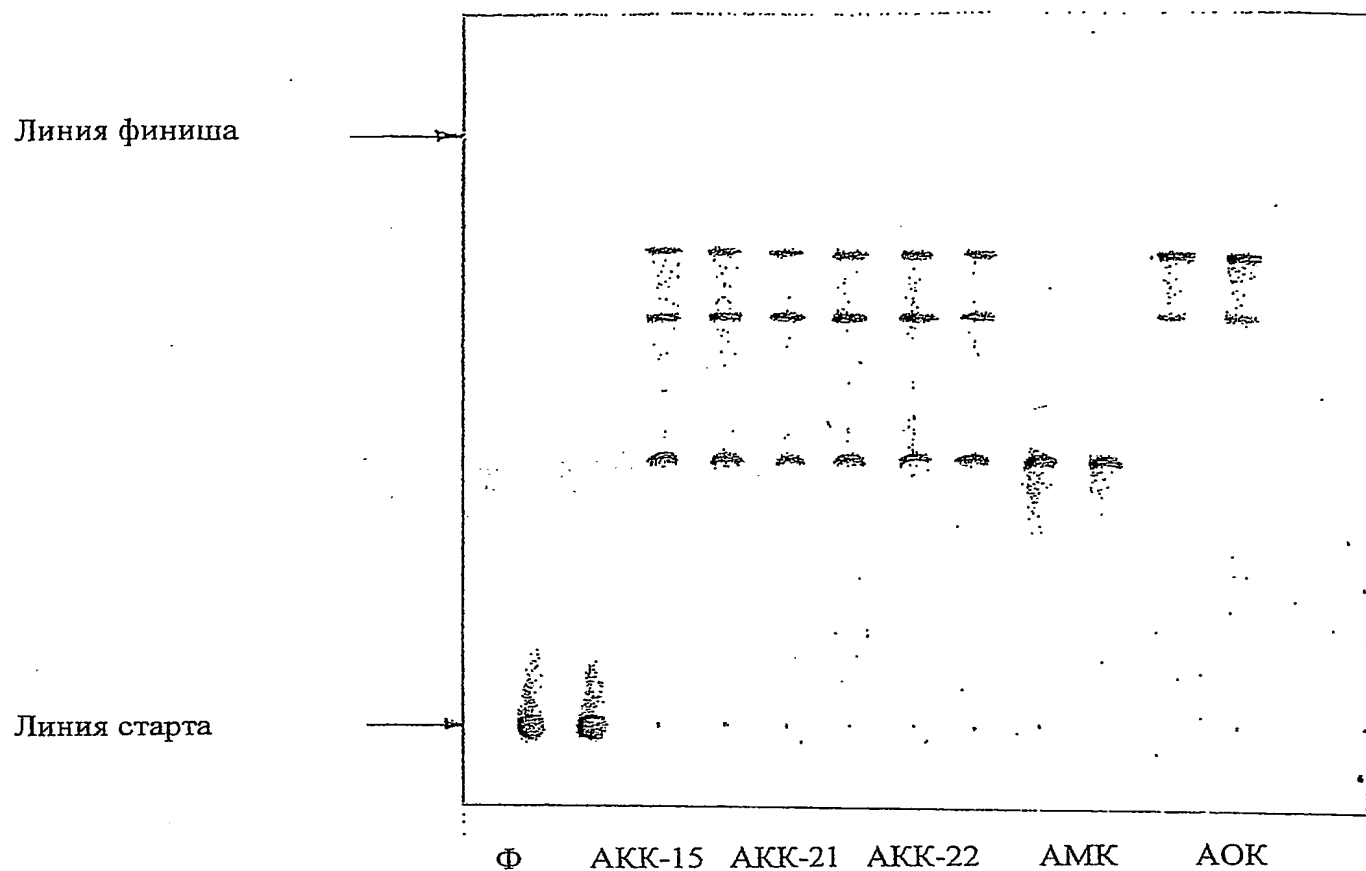
5/9



Фиг. 4

THIS PAGE BLANK (USPTO)

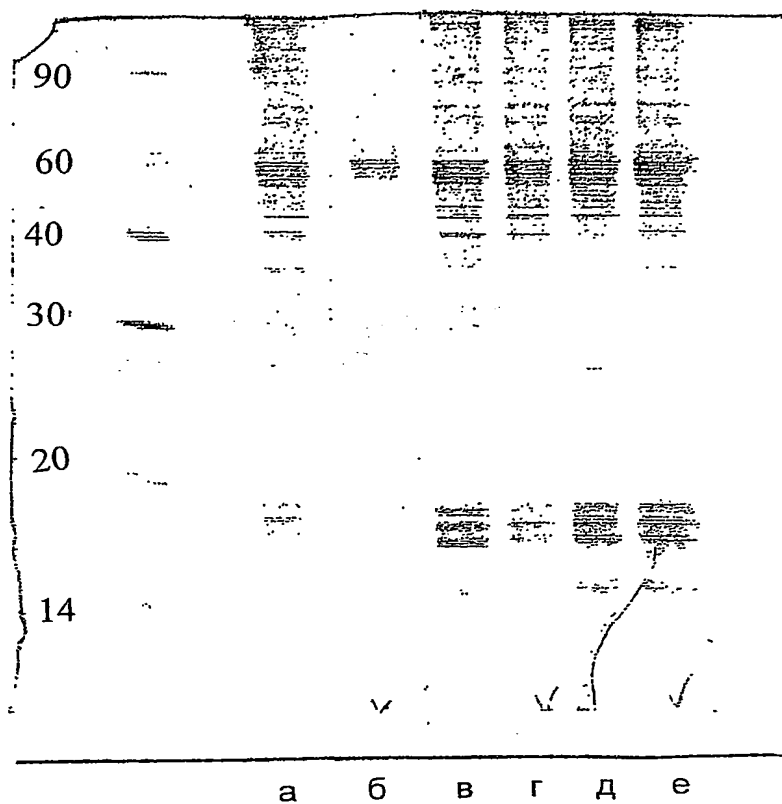
6/9



Фиг. 5

THIS PAGE BLANK (USPTO)

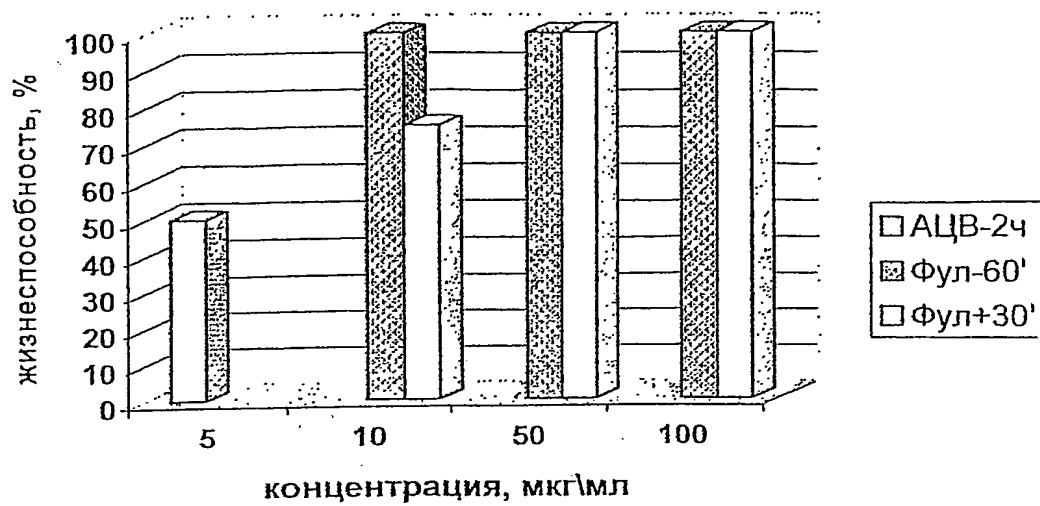
7/9



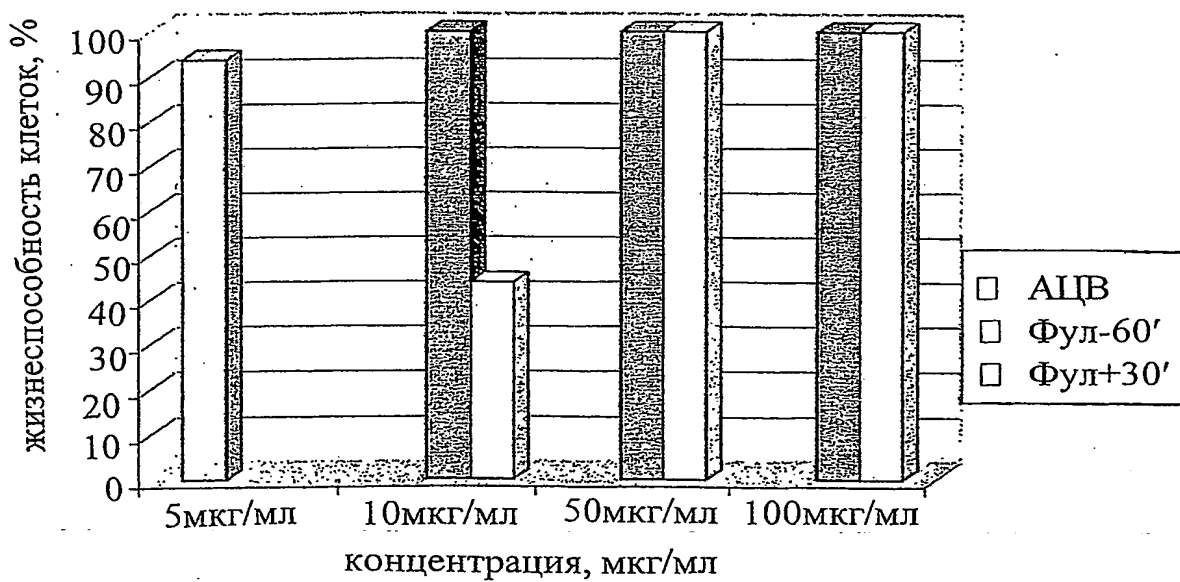
Фиг. 6

THIS PAGE BLANK (USPTO)

8/9



Фиг. 7.1



Фиг. 7.2

THIS PAGE BLANK (USPTO)

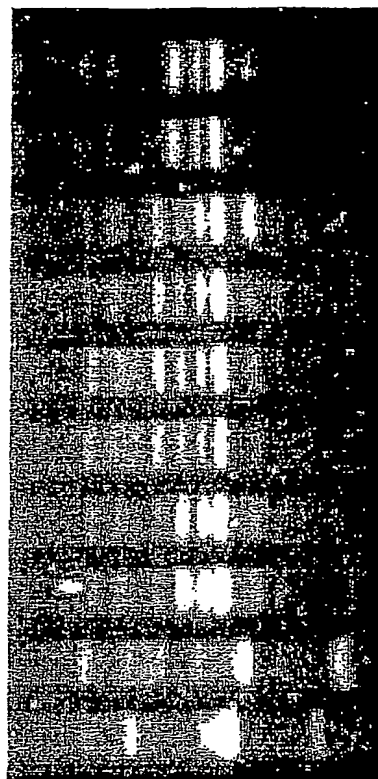
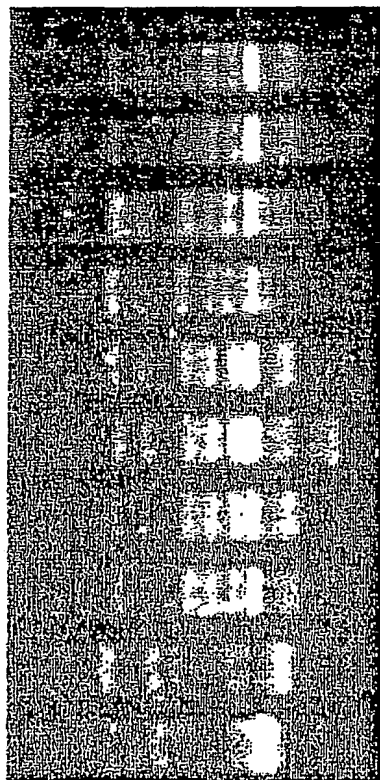
9/9

0 суток

1 сутки

Ма в Ка в 10а в 50а в 100а в

Ма в Ка в 10а в 50а в 100а в

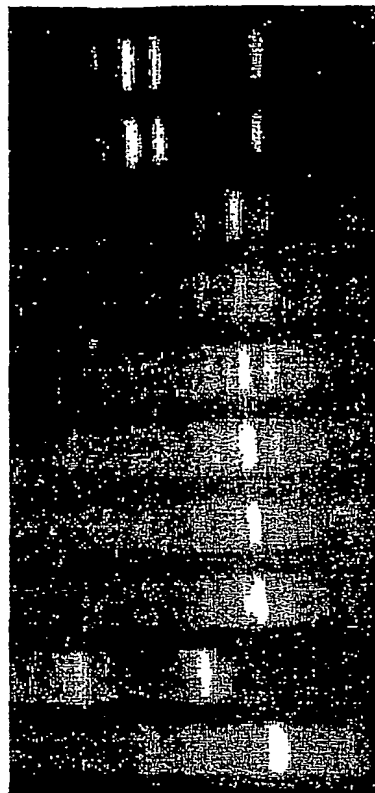
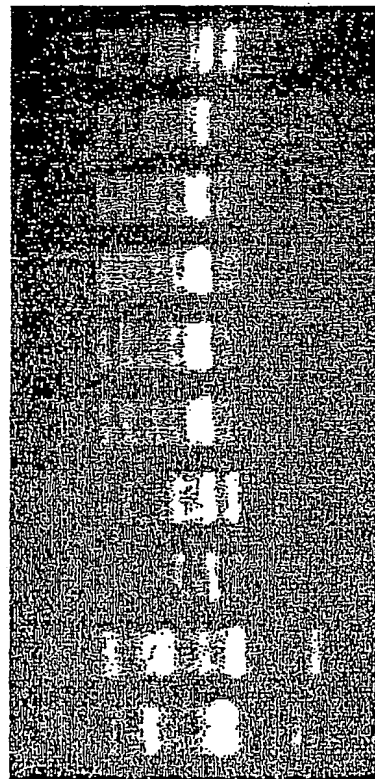


2 сутки

7 сутки

Ма в Ка в 10а в 50а в 100а в

Ма в Ка в 10а в 50а в 100а в



Фиг. 8

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)